

一過性虚血及び抗コリン薬スコポラミン誘発の学習障害に 対する四物湯の改善作用及び処方解析

張 紹輝^{a)} 東田 道久^{a)} 村上 孝寿^{a)} 松本 欣三^{a)} 小島 暁^{b)} 渡辺 裕司^{*a)}

^{a)}富山医科薬科大学・和漢薬研究所・生物試験部門, ^{b)}養命酒製造(株)・中央研究所

Shimotsu-to improves transient cerebral ischemia and scopolamine-induced impairment in passive avoidance performance in mice

Shaohui ZHANG^{a)} Michihisa TOHDA^{a)} Yukihiisa MURAKAMI^{a)}
Kinzo MATSUMOTO^{a)} Satoru KOJIMA^{b)} and Hiroshi WATANABE^{*a)}

^{a)}Department of Pharmacology, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University,

^{b)}Central Research Laboratories, Yomeishu Seizo Co., Ltd

(Received January 9, 2001. Accepted April 18, 2001.)

Abstract

In the previous paper, our group reported that Shimotsu-to improved scopolamine-induced spatial cognitive deficits in rats using an 8-arm radial maze. In the present study, we investigated the effect of Shimotsu-to on the impairment induced by transient cerebral ischemia in mice in passive avoidance performance. Shimotsu-to (6.0 g/kg, p.o.) administered one hour before operation showed the protective effect on impairment induced by the cerebral ischemia reperfusion. We also studied the efficacy of Shimotsu-to and its four crude fractions, Angelica Root, Cnidium Rhizome, Peony Root and Rehmannia Root on scopolamine-induced acquisition impairment. Shimotsu-to prevented scopolamine-induced acquisition impairment at dose of 1.5 and 6.0 g/kg (p.o.). Among the four constituents, Angelica and Peony prolonged the latency of step-down and decreased the number of errors in the retention trial at a high dose (1.5 g/kg, p.o.). Whereas Rehmannia and Cnidium did not show any effect in the same performance. These results suggested that Angelica and Peony played an important role in the anti-amnesic effect of Shimotsu-to. The effect of Shimotsu-to on amnesia could not be explained entirely by the contribution of Angelica and Peony. The absence of any one of its constituents resulted in the loss of activity.

Key words Shimotsu-to, passive avoidance performance, scopolamine, transient cerebral ischemia, tacrine, mice.

緒 言

四物湯は当帰、川芎、芍薬及び地黄の四種の構成生薬が等量混合されており、「和剂局方」に初めて記載され、「補血」や「駆瘀血」作用をもち、主に冷え性など「血虚」の症状の婦人病治療薬として用いられる基本的な漢方

剤である¹⁾。四物湯は放血及び鉄欠乏飼料で飼育した心虚証モデル動物の赤血球数およびヘモグロビン量、ヘマトクリット値を改善することが報告されている²⁾。近年、老年期痴呆患者に対して四物湯は釣藤散との合剤として用いられ、有効性が報告されるようになった³⁾。我々の研究グループは8方向放射状迷路課題を用い、四物湯がラットの実験的空間学習障害を改善することを報告し

*〒930-0194 富山市杉谷2630
2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

た⁴⁾。しかし、そのような学習行動障害の改善効果における四物湯構成生薬の役割はまだ明らかにされていない。そこで、今回、両側総頸動脈を一時的に結紮後再開通(2VO)あるいはスコポラミンを前処置したマウスにみられる受動的回避学習障害に対する四物湯の改善作用を確認した後、スコポラミンで誘発される学習障害に対する構成生薬の役割について検討した。

材料と方法

(1) 実験材料と方法

使用動物

実験に用いた ddY 系雄性マウス (7 週齢) は日本エスエルシー (株) (静岡) より購入し、約 1 週間、飼育室の飼育環境に慣らした。マウスは 1 ケージ当たり 8-9 匹を同居させ、12 時間の明暗周期、恒温 (25±1°C)、恒湿 (55±5%) で飼育した。

四物湯および構成生薬水エキスの調製

四物湯、その構成生薬単味、当帰と芍薬の混合物および四物湯の構成生薬のうちから一味ずつを除いた三味の生薬を組み合わせた混合物をそれぞれ 10 倍の蒸留水中で、100°C、1 時間加熱抽出し、綿栓で濾過した。濾液は液体窒素で凍結し、凍結乾燥した。抽出率は Table I に示した。

両側総頸動脈の結紮と再開通

Urethane (1.5 g/kg, 東京化成, 東京) 麻酔下で、マウスの頸部を切開し、切開口より左右の総頸動脈を注意深く露出し、両動脈を同時に絹製縫合糸で結紮した。また、マウスの尾部の先端より 1 cm を切開し、0.3 ml を瀉血した。結紮 20 分後に、結紮を解放して血流を再開した。両側総頸動脈を結紮後再開通したマウスを 2VO 群とした。また、結紮及び瀉血は行わずに同様の手術を施したマウスを sham 群とした。四物湯の水エキスは 2VO の 1 時間前に経口投与した。2VO 処置の 2 日後に受動的

回避学習課題の訓練試行、さらに 1 日後に保持試行を行った。

(2) 実験装置および方法

実験装置

装置 (30×25×25 cm) は床グリットとその一角に設置した円形プラットホーム (直径 4.5 cm, 高さ 4.5 cm) からなり、グリットは電気刺激を与えるための刺激装置に接続した。

受動的回避学習課題 (Step down)

訓練試行ではまずマウスを装置のプラットホーム上に置き、最初の 3 分間は慣らし時間とした。続く 5 分間を訓練試行とし、マウスが床グリットに降りる毎に、プラットホームに上がるまで連続的な電気ショック (0.4 mA) を与えた。訓練試行の 24 時間後に保持試行を行った。マウスをプラットホーム上に置き、床におりるまでの潜時 (latency) 及び 5 分間の保持試行中に床に降りた回数 (error) を記録した。

(3) 薬物処置

Scopolamine hydrobromide (Sigma Chemical Co., St. Louis, 米国) は訓練試行の 15 分前に腹腔内投与し、四物湯、構成生薬及びその組み合わせの熱水抽出エキスは訓練試行の 60 分前に経口投与した。Tacrine (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine HCl; Sigma Chemical Co., St. Louis, 米国) は訓練試行の 60 分前に腹腔内投与した。

(4) 自発運動量測定

Scanet SV-10 自動測定プログラム (東洋産業, 富山) を用い、測定装置内のケージにマウスを 1 匹ずつ入れ、マウスの水平運動量及び立ち上がり行動数を近赤外線センサーで 30 分間測定した。インターバル時間は 10 分とした。

(5) 統計学的処理

latency および errors は Mann-Whitney's U- test で群間の比較を行った。有意水準は $P < 0.05$ とした。

Table I Extract yields of Shimotsu-to, mixtures without one crude fraction and the crude fraction.

| Extract | yields % (W/W) | Extract | yields % (W/W) |
|-------------|----------------|------------------|----------------|
| Shimotsu-to | 38.5 | Angelica | 43.49 |
| Shimotsu-to | | Peony | 43.94 |
| - Cnidium | 47.83 | Rehmannia | 47.19 |
| - Rehmannia | 34.47 | Cnidium | 32.11 |
| - Peony | 44.23 | Angelica + Peony | 37.67 |
| - Angelica | 43.43 | (1:1) | |

These extracts were prepared by being heating at 100°C for 1 hour in 10 volumes of ion-exchanged water and then were filtered through a mesh and lyophilized with a freeze-drier.

結 果

1. 2VO 及びスコポラミン誘発のマウス学習行動障害に対する四物湯の作用

両側総頸動脈を一時的に結紮後再開通したマウスにおいては latency が sham 群に比べ有意に減少し ($P < 0.01$), 逆に error は高値を示した ($P < 0.05$) (Fig. 1)。四物湯 (6.0 g 乾燥重量/kg) を 2VO の 1 時間前に経口投与しておく, latency の減少 ($P < 0.01$) と error の増加 ($P < 0.01$) 共に抑制された。一方, スコポラミン (1.0

mg/kg, i.p.) の投与により認められる latency の有意な減少 ($P < 0.01$) と error の有意な増加 ($P < 0.01$) は, 四物湯 (1.5 および 6.0 g/kg, i.p.) の前処置により抑制された (Fig. 2)。標準薬 Tacrine (2.5 g/kg) はスコポラミンで誘発した latency の減少を改善し ($P < 0.05$), error の増加も抑えた ($P < 0.05$) (Fig. 3)。

2. スコポラミン誘発の学習行動障害に対する構成生薬単味の作用

当帰 (Angelica) 375 mg/kg は, 改善する傾向を示し, 1.5 g/kg はスコポラミンにより減少した latency を回復させ ($P < 0.05$), 増加した error を抑制させた ($P < 0.05$)。

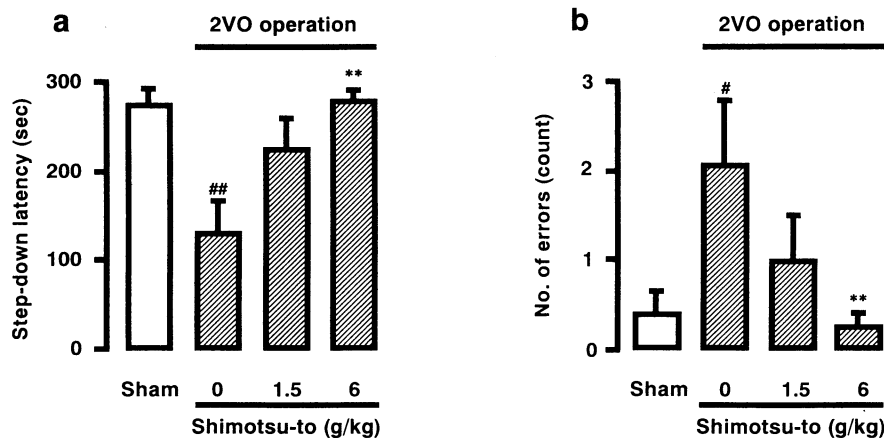


Fig. 1 Effect of Shimotsu-to on improving memory acquisition impairment caused by cerebral ischemia-reperfusion (2VO) in mice. Shimotsu-to (0, 1.5, 6 g/kg, p.o.) was administered 60 min before 2VO operation. Two days after the operation, the training test was performed. Step down latency (a) and the number of errors (b) were expressed as the mean \pm S.E.M. ($n=8-11$). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. sham group. ** $P < 0.01$ vs. vehicle treated 2VO group.

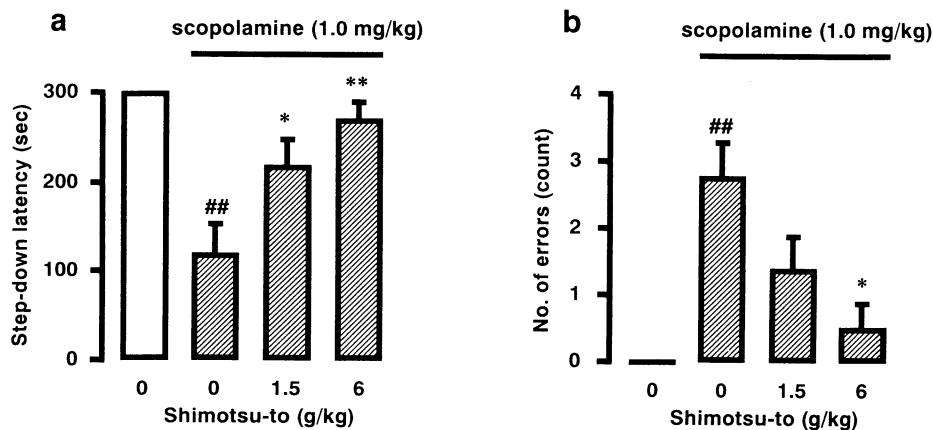


Fig. 2 Effect of Shimotsu-to on improving memory acquisition impairment induced by scopolamine in mice. Shimotsu-to (0, 1.5, 6 g/kg, p.o.) was administered 60 min before the learning trial and scopolamine (1.0 mg/kg, i.p.) was injected 15 min prior to the learning trial. Step down latency (a) and the number of errors (b) were expressed as the mean \pm S.E.M. ($n=8$). ## $P < 0.01$ vs. normal saline group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle treated scopolamine group.

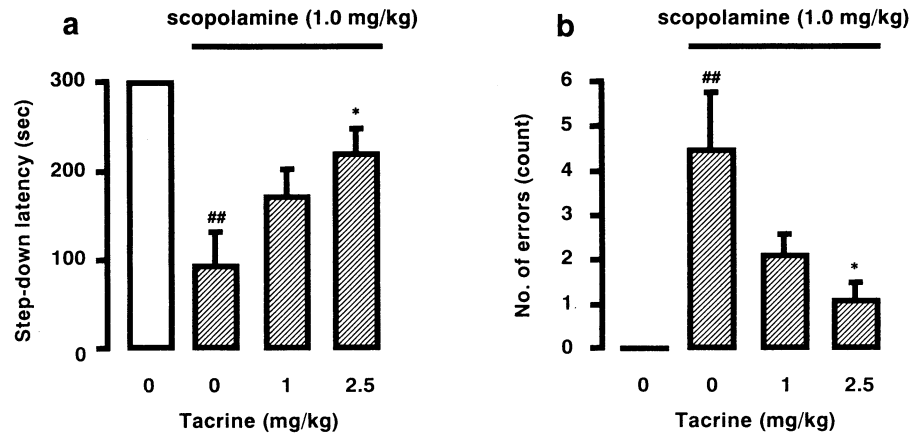


Fig. 3 Effect of Tacrine on improving memory acquisition impairment induced by scopolamine in mice. Tacrine (0, 1, 2.5 mg/kg, i.p.) was administered 60 min before the learning trial and scopolamine (1.0 mg/kg, i.p.) was injected 15 min prior to the learning trial. Step down latency (a) and the number of errors (b) were expressed as the mean \pm S.E.M. (n=8). ^{##} $P < 0.01$ vs. normal saline group; ^{*} $P < 0.05$ vs. vehicle treated scopolamine group.

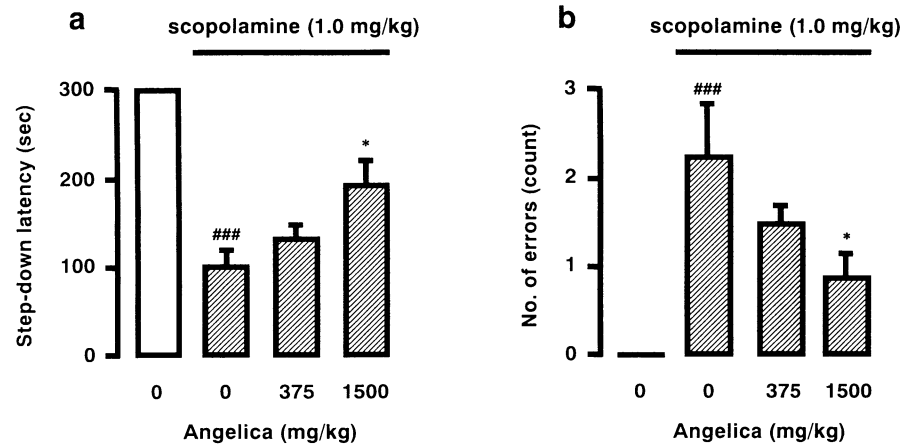


Fig. 4 Effect of Angelica on improving memory acquisition impairment induced by scopolamine in mice. Angelica (0, 375, 1500 mg/kg, p.o.) was administered 60 min before the learning trial and scopolamine (1.0 mg/kg, i.p.) was injected 15 min prior to the learning trial. Step down latency (a) and the number of errors (b) were expressed as the mean \pm S.E.M. (n=8-9). ^{###} $P < 0.001$ vs. normal saline group, ^{*} $P < 0.05$ vs. vehicle treated scopolamine group.

(Fig. 4)。芍薬 (Peony) 1.5 g/kg の投与群では latency の減少と error の増加は有意に抑制された ($P < 0.01$)。375 mg/kg の投与群でも弱い改善作用が見られた (Fig. 5)。他の2種の生薬、川芎 (Cnidium) と地黄 (Rehmannia) は、両用量でもスコポラミンで誘発した学習行動障害に対する改善作用を示さなかった (データ省略)。

3. スコポラミン誘発の学習行動障害に対する四物湯構成生薬組み合わせの作用

latency の有意な減少および error の有意な増加に対して、当帰と芍薬の混合水エキス (四物湯の 1.5 g/kg に

相当する用量 750 mg/kg) は改善作用を示さなかった。また、改善作用が認められた低用量の四物湯構成生薬のうち、地黄を除いた芍薬、当帰、川芎の混合エキス、川芎を除いた芍薬、当帰、地黄の混合エキス、当帰を除いた芍薬、川芎、地黄の混合エキスおよび芍薬を除いた当帰、川芎、地黄の混合エキスを訓練試行の60分前に経口投与しても改善作用は認められなかった (Fig. 6)。

4. 自発運動量に対する四物湯の作用

スコポラミンの投与群の水平運動量及び立ち上がり行動数は対照群に比べ有意に増加した ($P < 0.05$)。しかし、

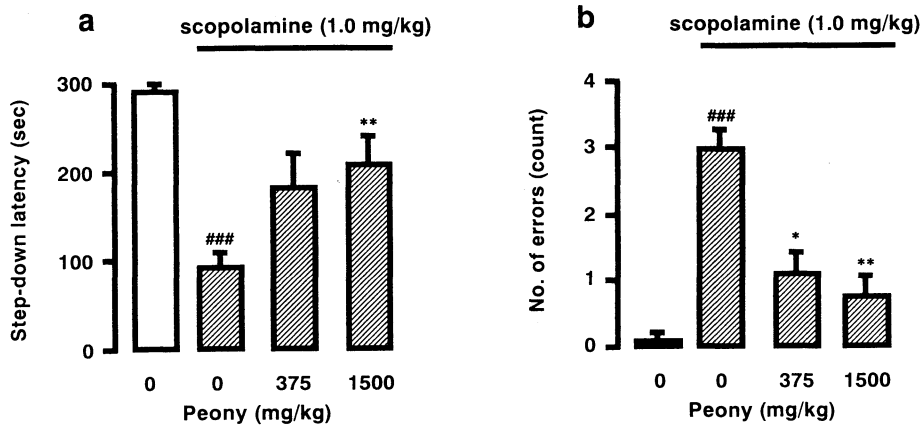


Fig. 5 Effect of Peony on improving memory acquisition impairment induced by scopolamine in mice. Peony (0, 375, 1500 mg/kg, p.o.) was administered 60 min before the learning trial and scopolamine (1.0 mg/kg, i.p.) was injected 15 min prior to the learning trial. Step down latency (a) and the number of errors (b) were expressed as the mean±S.E.M. (n=8-9). ### P<0.001 vs. normal saline group, * P<0.05, ** P<0.01 vs. vehicle treated scopolamine group.

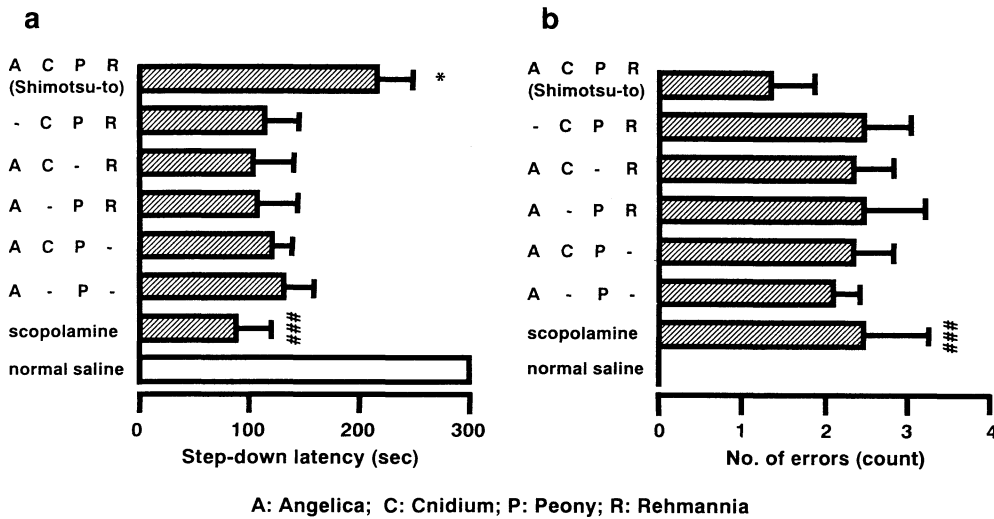


Fig. 6 Synergism on the four constituents of Shimotsu-to. Each combination of the constituents (375 mg/kg of each, p.o.) was administered 60 min before the learning trial and scopolamine (1.0 mg/kg, i.p.) was injected 15 min prior to the learning trial. Step down latency (a) and the number of errors (b) were expressed as the mean±S.E.M. (n=8-9). A: Angelica; C: Cnidium; P: Peony; R: Rehmannia. ### P<0.001 vs. normal saline group, * P<0.05 vs. vehicle treated scopolamine group.

四物湯はスコポラミンの投与により増加した水平運動量及び立ち上がり行動数に影響を及ぼさなかった(データ省略)。

考 察

本実験では、一過性の脳虚血マウスにみられる学習障害に対する四物湯の効果を検討した。一過性虚血処置の

みでは、学習障害が起き難いが、0.3 ml の瀉血を行うと、低血圧になり、学習障害が起き易くなると考えられる。高用量の四物湯は虚血再開通手術の1時間前に経口投与しておく、2日後の記憶保持試行において短縮された latency を回復し、増加した error を抑制した。一時的な脳血流の停止や無酸素状態など異常状態に陥ると脳機能は一時的あるいは永久的に障害を受け、結果として、記憶障害をおこす。今回の結果より、四物湯は一過性の脳

虚血による記憶障害に予防効果を有することが示唆された。一過性の脳虚血が起こると、海馬や大脳皮質においては、神経終末からグルタミン酸の放出により細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇、フリーラジカルの上昇などの顕著な変動が起こり、遅発性神経死に至ることが知られており、⁸⁻¹⁴⁾ 四物湯はこれらの変動に抑制的に関与している可能性も考えられる。四物湯は放血及び鉄欠乏飼料で飼育した心血虚証モデル動物の症状を改善することから、²⁾ 虚血による記憶障害に対する改善作用も機序として考えられる。

中枢コリン神経系は、学習・記憶に重要な役割を果たしている神経系の1つとして古くから知られている。実際、スコポラミンを正常人に投与すると痴呆患者の症状に類似した記憶障害を生じる。¹⁵⁾ そこで、スコポラミンで誘発した学習障害に対する四物湯の作用を検討したところ、スコポラミンの投与により生ずる latency の有意な減少と error の有意な増加は四物湯 (1.5, 6.0 g/kg, p.o.) の前処置により抑制された。一過性虚血の処置により、マウス脳内のアセチルコリンの含量は低下することが報告されており、¹⁶⁾ 四物湯を前処置すると、線状体におけるスコポラミンの投与によりアセチルコリン含量の減少は有意に回復したことから、¹⁷⁾ 2VO マウスの学習行動障害に対する四物湯の改善作用にはコリン神経系の役割が大きいと推測される。コリンエステラーゼ阻害剤である標準薬 tacrine は Morris 型水迷路課題や8方向放射状迷路課題においてスコポラミン誘発の空間的学習障害を改善することや、^{18,19)} 前脳基底部を破壊したラットにみられる受動的回避障害および空間的学習障害を回復すること^{20,21)} が報告されている。本実験においても、tacrine は前処置によりスコポラミンで誘発された受動的回避学習障害を改善した。

四物湯はスコポラミンの投与により増加した水平運動量及び立ち上がり行動数に影響を及ぼさなかったことから、四物湯の学習障害の改善作用は自発運動量の増加に関係がないと考えられる。

受動的回避学習障害を改善した四物湯 1.5 g/kg は 375 mg/kg の四味の各生薬より構成されている。そこで、375 mg/kg および4倍の用量 1.5 g/kg を用いて、四物湯の各構成生薬の役割について検討した。当帰、芍薬はいずれも高用量の場合に改善作用が認められた。低用量の場合は、当帰は改善する傾向を示し、芍薬には弱い改善作用が見られた。芍薬の成績は以前の Ohta らの成績²²⁾ と一致した。他の2種の生薬、川芎と地黄にはスコポラミンで誘発した学習行動障害に対して全く改善作用を示さなかった。有意な改善作用を示した四物湯の低用量に相当する各構成生薬の用量すなわち 375 mg/kg では当帰、

川芎、地黄では改善作用を示せず、芍薬でも弱い改善作用しか示さなかったことより、各構成生薬の間に相乗作用があるのではないかと考え、次の実験を行った。まず、1.5 g/kg の高用量で改善作用を示した当帰と芍薬に着目し、当帰と芍薬を混合後に抽出した水エキスを、改善作用が認められた四物湯の低用量に相当する用量を用いて実験を行った。当帰と芍薬の混合エキスは学習行動障害に対して改善作用を示さなかった。当帰と芍薬を混合後抽出したエキスの中では、2種類の生薬では含んでいない成分が得られたと考えられた。また、1.5 g/kg 用量の四物湯構成生薬のうち、地黄を除いた芍薬、当帰、川芎の混合エキス、川芎を除いた芍薬、当帰、地黄の混合エキス、当帰を除いた芍薬、川芎、地黄の混合エキスおよび芍薬を除いた当帰、川芎、地黄の混合エキスについて試験したが、いずれの混合エキスにも改善作用は認められなかった。以上の結果から、四物湯の学習行動障害改善作用には、芍薬とその成分 paeoniflorin²²⁾ 及び当帰が寄与するものの単独での作用は弱く、強い有意な有効性を示すためには、四味すべてが必要であると考えられた。

謝 辞

本研究は文部省科学研究費 (No. 11470511) によって行われたものである。また、実験者の補助をしていただいた(財)日中医学協会及び(財)平和中島財団に御礼を申し上げます。

References

- 1) Chen, S. (ed) Zeng guan Taipinghuimin Hejijufan Enterprise Co., Ltd., Tokyo, page 150, 1988.
- 2) Kojima, S., Ezaki, N., Inoue, M., Yanagisawa, K., Sugawara, Y.: Studies of tonification in traditional Chinese medicine: Effect of Shimotsu-to and Kihito-to on the anemic rats. *Journal of Traditional Medicines*. **11**, 231-235, 1994.
- 3) Narita, H: Kampo and encephalopathy. In "Sequela of Senile Cerebro-Vascular Disorder and Kampo" (Ed. by Araki, G.), Iyaku (Medicine and Drug) Journal Co., Ltd. Tokyo, pp.16-24, 1991. (In Japanese)
- 4) Watanabe, H., Ni, J.W., Ohta, H., Ni, X.H., Matsumoto, K.: A Kampo Prescription, Shimotsu-to, Improves Scopolamine-induced Spatial Cognitive Deficits in Rats. *Japanese Journal of Psychopharmacology*. **11**, 215-222, 1991.
- 5) Gorelick, P.B.: Status of risk factors for dementia associated with stroke. *Stroke*. **28**, 459-463, 1997.
- 6) Nyenhuis, D.L., Gorelick, P.B.: Vascular dementia: a contemporary review of epidemiology, diagnosis, prevention and treatment. *Journal of the American Geriatrics Society*. **46**, 1437-1448, 1998.
- 7) Tatemichi, T.K., Desmond, D.W., Paik, M., Figueroa, M., Gropen, T.I., Stern, Y., Sano, M., Remien, R., Williams, J.B., Mohr, J.P.:

- Clinical determinants of dementia related to stroke. *Annals of Neurology*. **33**, 291-298, 1990.
- 8) Choi, D.W.: Excitotoxic cell death. *J Neurobiol*. **23**, 1261-1276, 1992.
 - 9) Kitagawa, K., Matsumoto, M., Oda, T., Niinobe, M., Hata, R., Handa, N., Fukunaga, R., Isaka, Y., Kimura, K., Maeda, H., Mikoshiba, K., Kamada, T.: Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. *Neuroscience*. **35**, 551-558, 1990.
 - 10) Nakagomi, T., Sakai, T., Kirino, T., Tamura, A., Noguchi, M., Saito, I., Takakura, K.: Effect of cyclooxygenase and lipoxigenase inhibitors on delayed neuronal death in the gerbil hippocampus. *Stroke*. **20**, 925-929, 1989.
 - 11) Kirino, T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Research*. **239**, 57-69, 1982.
 - 12) Nanri, M., Yamamoto, J., Miyake, H., Watanabe, H.: Protective effect of GTS-21, a novel nicotinic receptor agonist, on delayed neuronal death induced by ischemia in gerbils. *Jpn. J. Pharmacol*. **76**, 23-29, 1988.
 - 13) Araki, T., Kato, H., Kogure, K.: Energy metabolism in delayed neuronal death of CA1 neurons of the hippocampus following transient ischemia in the gerbil. *Metab Brain Dis*. **1**, 263-278, 1989.
 - 14) Lin, C.S., Polsky, K., Nadler, J.V., Crain, B.J.: Selective neocortical and thalamic cell death in the gerbil after transient ischemia. *Neuroscience*. **35**, 289-299, 1990.
 - 15) Drachman, D. A., Leavitt, J.: Human memory and cholinergic system: A relationship to aging? *Arch. Neurol*. **30** (2), 113-121, 1974.
 - 16) Xu, J., Murakami, Y., Matsumoto, K., Tohda, M., Watanabe, H., Zhang, S.H., Yu, Q., Shen, J.: Protective effect of Oren-gedoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) against impairment of learning and memory induced by transient cerebral ischemia in mice. *J Ethnopharmacol*. **73** (3), 405-413, 2000.
 - 17) Watanabe, H.: Pharmacological evaluation of herbal medicine: Effects of Shimotsu-to and its constituents on spatial cognitive deficits in rats. *Nippon Toyo Iyaku Zasshi*. **47** (5), 713-727, 1997. (In Japanese)
 - 18) Jackson, J. J. & Soliman, M. R. I.: Effect of Tacrine (THA) on spatial reference memory and cholinergic enzymes in specific rat brain regions. *Life Sciences*. **58** (1), 47-54, 1996.
 - 19) Akazawa, K., Matsumoto, K., Shimizu, M., Ichiki, H., Maruno, M., Watanabe, H.: Effects of paeoniflorin and paeoniflorin-related glycosides on scopolamine-induced disruption of radial maze performance in rats. *Journal of Traditional Medicines*. **13**, 243-247, 1996.
 - 20) Riekkinen, P. J., Sirvio, J., Riekkinen, M., Riekkinen, P.: Reference and working memory of rat following hippocampal damage induced by transient forebrain ischemia. *Physiol. Behav*. **37**, 387-392, 1991.
 - 21) Ni, J.W., Ohta, H., Matsumoto, K., Watanabe, H.: The beneficial effect of Hakushijin (Biota) and Hakushijin-gan on experimental spatial cognitive deficits in rats. *Journal of Medical and Pharmaceutical Society for WAKAN-YAKU*. **10**, 118-125, 1993.
 - 22) Ohta, H., Ni, J.W., Matsumoto, K., Watanabe, H., Shimizu, M.: Peony and its major constituent, paeoniflorin, improve radial maze performance impaired by scopolamine in rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behaviour*. **45** (3), 719-723, 1993.